

- WOSNICK, M. A. and B. N. WHITE, 1977. A doubtful relationship between tryosine tRNA and suppression of the vermilion mutant in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 11: 3919-3930.
- ZÜST, H., A. H. EGG, H. A. HOSBACH und E. KUBLI, 1972. Regulation von Darmenzym-aktivitäten und Isozymmuster der Hexokinase bei der Letalmutante 1(2)me von *Drosophila melanogaster*. *Verh. schweiz. naturf. Ges.* 152: 172-182.

P.S. Chen und M. Neuweg. — Identifikation des Tyrosin-O- β -glucosids bei *Drosophila busckii*.¹ (Mit 5 Abbildungen).

Zoologisches Institut der Universität Zürich, CH-8006 Zürich.

ABSTRACT

Identification of tyrosine-O- β -glucoside in *Drosophila busckii*. — *Drosophila busckii* differs from all other *Drosophila* species in having no trace of tyrosine-O-phosphate in the mature larvae. Instead, a new ninhydrin-reacting substance has been found. The results from chromatographic, electrophoretic and other biochemical analyses of the isolated compound all indicate that it is tyrosine-O- β -glucoside. Its rapid increase in concentration during the later part of larval development and its sudden disappearance at pupariation suggest that it serves as tyrosine reservoir. Our studies on the biosynthesis and metabolism of this glucoside are now in progress.

In einer früheren Mitteilung (CHEN 1975) haben wir beschrieben, dass die Larven von *Drosophila busckii* ein bisher unbekanntes Tyrosinderivat enthalten. Es unterscheidet sich chromatographisch und elektrophoretisch eindeutig vom Tyrosin-O-phosphat, welches bei allen übrigen *Drosophila*-arten vorkommt. Im Laufe unserer weiteren Untersuchungen konnte dieses Derivat als Tyrosin-O- β -glucosid identifiziert werden. Im folgenden fassen wir die Ergebnisse kurz zusammen. Ausführliche Einzelheiten sollen in einer späteren Publikation veröffentlicht werden.

MATERIAL UND METHODEN

Larven und Puppen des Wildtyps von *Drosophila busckii* wurden bei 25°C auf Standardfutter (Agar-Zucker-Mais-Hefe) oder Frischhefesuspension, die über mit Agar ausgegossenen Petrischalen gestrichen worden war, aufgezogen. Unter der vorlie-

¹ Ausgeführt mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

genden Bedingung dauerte die Entwicklung von der Eiablage bis zur Verpuppung ca. 7 Tage. Nach weiteren 4 Tagen der Puppenentwicklung erfolgte das Schlüpfen der Adultfliegen.

Für analytische Untersuchungen der Aminosäuren und Derivate wurden die Larven beziehungsweise Puppen des gewünschten Stadiums in einem Mikro-Glashomogenisator mit 80% Methanol homogenisiert und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für die Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie verwendet. Nach der Auftrennung wurden die quantitativen Bestimmungen der einzelnen ninhydrinpositiven Komponenten nach der Methode von FISCHER & DÖRFEL (1953) vorgenommen.

Für die Isolation des Tyrosinderivates wurden 10–30 g verpuppungsreife Larven in 100% Methanol unter Eiskühlung in einem Bühler-Homogenisator 10 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert, das Filtrat im Rotationsverdampfer bei 35°C eingedickt, und der Rückstand in ca. 25 ml Wasser aufgenommen. Nach Entfernung der Lipide durch Schütteln mit Chloroform wurde der Extrakt erneut eingedickt und der Rückstand in 5 ml 15% Ameisensäure gelöst.

Die Fraktionierung des rohen Extrakts geschah auf einer Dowex 50W-X4-Säule ($1,6 \times 74$ cm), die mit 0,1M Ammoniumformiat (pH 2,9) äquilibriert war. Die aufgetragene Probe wurde mit 0,15M Ammoniumformiat (pH 3,3) eluiert. Diejenigen Fraktionen, die das Glucosid enthielten, wurden zusammengekommen und unter Vakuum konzentriert. Schliesslich wurde die so erhaltene Probe auf einer Sephadex G-10-Säule ($0,9 \times 154$ cm) mit 0,1M Essigsäure entsalzt. (für Einzelheiten siehe CHEN 1977).

Zwei Methoden wurden für die Hydrolyse des gereinigten Glucosids gebraucht. Bei der ersten Methode wurde die Probe in 2N HCl bei 100°C während 90 Minuten erhitzt. Bei der zweiten Methode wurde die Probe in einer Acetatpufferlösung (0,2M, pH 5,5) bei 30°C während 60 Minuten mit α -Glucosidase (Boehringer, Mannheim), β -Glucosidase (Fluka, Buchs) oder β -Galactosidase (Boehringer, Mannheim) inkubiert.

Für den Nachweis von Tyrosin und Zucker im Hydrolysat verwendeten wir die folgenden Methoden: Das auf dem Papierchromatogramm aufgetrennte Tyrosin wurde mit 0,5% Ninhydrin in Aceton lokalisiert. Die Prüfung der reduzierenden Gruppen im Zucker wurde mit alkalischem AgNO_3 nach SHERMA & ZWEIG (1971) und mit dem Benedict-Reagens nach CLOTTEN & CLOTTEN (1962) durchgeführt. Mit NaJO_4 und KMnO_4 nach der Methode von WOLFROM & MILLER (1956) erfolgte der Nachweis der α -Diol-Gruppierung.

Für Dünnschichtchromatographie wurde das Hydrolysat mit Pyridin gemischt und auf eine DC-Alufolie (Merck) aufgetragen. Nach Auftrennung in einem Gemisch bestehend aus Essigsäureäthylester, Isopropanol und 0,2M Natriumacetat (16:6:3) und Trocknen bei 100°C wurde das Chromatogramm mit dem α -Naphthol-Schwefelsäure-Reagens nach STAHL (1967) angefärbt.

Der enzymatische Nachweis der Glucose geschah mit den Clinitest-Streifen (Clinistix, Ames Co.), die Glucoseoxidase sowie Peroxidase und ein reduziertes Chromogen als Färbeindikatorsystem enthalten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, erweist sich das von uns isolierte Tyrosinderivat als rein. Nach der Auftrennung mit Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie in 70% n-Propanol ergab die Ninhydrinreaktion eine einzige feststellbare Substanz auf dem Chromatogramm. Die Lokalisation dieser Substanz entspricht genau derjenigen des charakteristischen Flecks, den wir bei der Analyse des Totalextrakts von *D. busckii*

Larven beobachtet haben (vergl. Abb. 1 in CHEN 1975). Die Prüfung mit dem automatischen Aminosäure-Analysator (Multichrom B) zeigte ebenfalls nur einen symmetrischen Peak, der nach 140 Minuten aus der Säule eluiert wurde.

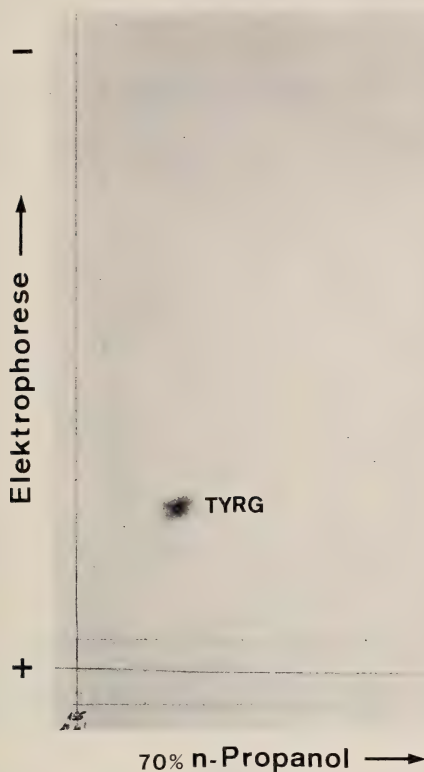


ABB. 1.

Eine Probe des isolierten und gereinigten Tyrosin-0- β -glucosids (TYRG) wurde auf Whatman 3MM Filterpapier (32 $\times$ 57 cm) aufgetragen und chromatographiert. 1. Dimension: Hochspannungselektrophorese (8% Ameisensäure; pH 1,5; 35 V/cm; 2h). 2. Dimension: Papierchromatographie (70% n-Propanol; aufsteigend; 22 h).

Nach saurer Hydrolyse wurde das Hydrolysat eingedickt, mit 0,1N NaOH neutralisiert und papierchromatographisch analysiert. Als einzige Aminosäure auf dem Chromatogramm wurde das Tyrosin nachgewiesen. Die Prüfungen auf reduzierende Stoffe ($\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$; Benedict-Reagens) und auf die α -Diol-Gruppierung ($\text{NaJO}_4/\text{KMnO}_4$) fielen positiv aus. Die vorliegenden Reaktionen sind jedoch keine spezifischen Nachweise für Zucker, da auch andere chemische Verbindungen gleichermassen reagieren. Um diese Schwierigkeit zu beheben, haben wir neben dem Hydrolysat Standardlösungen von verschiedenen Zuckern (Rhamnose, Fucose, Mannose, Fructose, Glucose, Galactose) gleichzeitig auf das Chromatogramm aufgetragen. Nach dreimaliger Auftrennung in 80% Isopropanol wurden die Zucker mit $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ sichtbar gemacht. Der Rf-Wert der reduzierenden Komponente im Hydrolysat ist eindeutig mit demjenigen der Glucose identisch (Abb. 2).

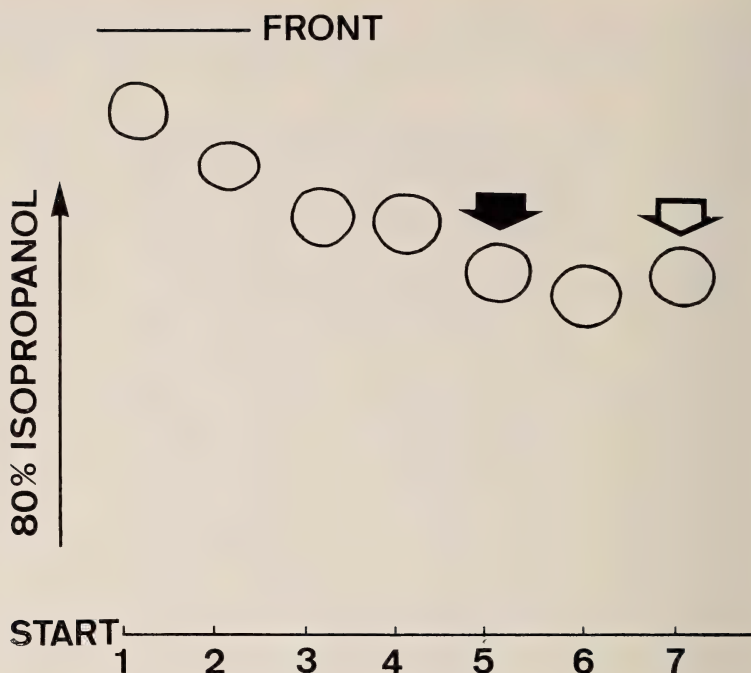


ABB. 2.

Papierchromatographie des sauren Hydrolysats von Tyrosinglucosid und verschiedenen Standard-Zuckerlösungen. Anfärbung mit alkalischem AgNO_3 . 1, Rhamnose; 2, Fucose; 3, Mannose; 4, Fructose; 5, Glucose; 6, Galactose; 7, Hydrolysat. Der Rf-Wert des Zuckers im Hydrolysat (offener Pfeil) ist identisch mit demjenigen der Glucose (gefüllter Pfeil).

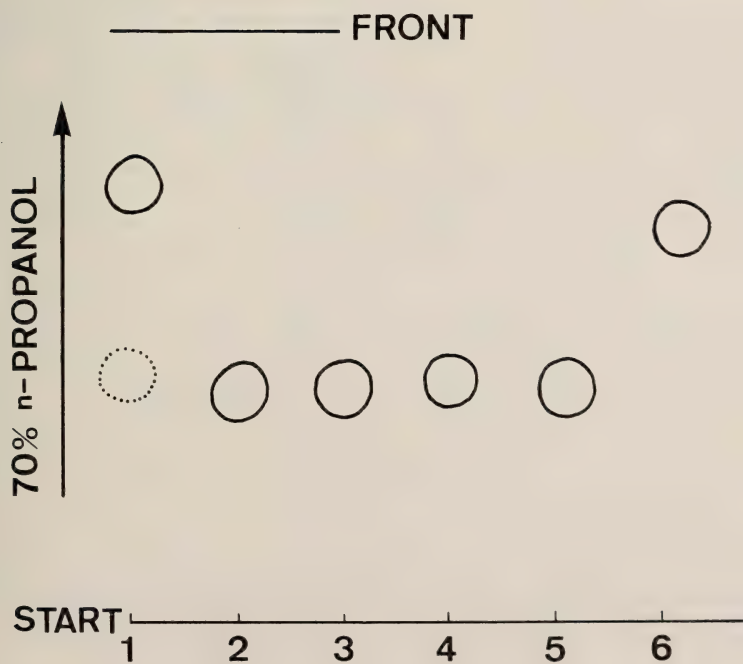
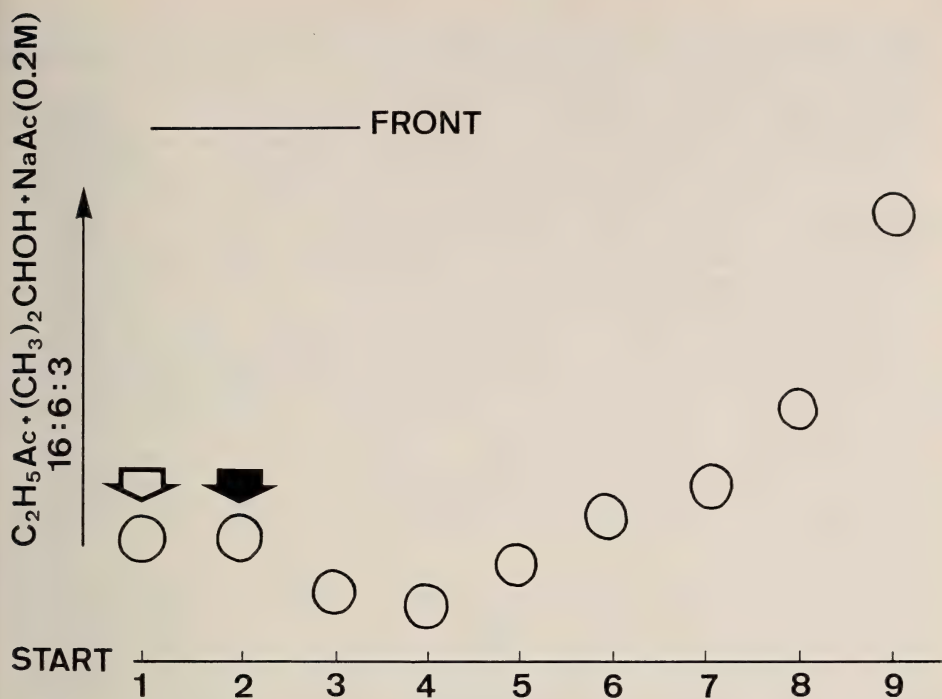
In einem weiteren Versuch wurde das Hydrolysat mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Vergleichszucker dienten Arabinose, Desoxyribose, Fructose, Glucose, Ribose, Lactose, Maltose und Saccharose. Das Ergebnis nach der Anfärbung mit α -Naphthol/ H_2SO_4 ist in Abbildung 3 dargestellt. Ein Vergleich der Rf-Werte bestätigt die oben erwähnte Schlussfolgerung, dass der Zuckeranteil des Tyrosinderivates die Glucose sein muss.

ABB. 3.

Dünnschichtchromatographie des sauren Hydrolysats von Tyrosinglucosid und verschiedener Vergleichszucker auf einer Kieselgur F-Schicht. Anfärbung mit α -Naphthol-Schwefelsäure-Reagens. 1, Hydrolysat; 2, Glucose; 3, Maltose; 4, Lactose; 5, Saccharose; 6, Fructose; 7, Arabinose; 8, Ribose; 9, Desoxyribose. Der Zucker im Hydrolysat (offener Pfeil) und Glucose (gefüllter Pfeil) weisen den gleichen Rf-Wert auf.

ABB. 4.

Papierchromatographie der Hydrolysate von Tyrosinglucosid nach Inkubation mit β -Glucosidase (1), α -Glucosidase (2), und β -Galactosidase (3). 4, Inkubation ohne Enzymzugabe; 5, Tyrosinglucosid; 6, Tyrosinstandard.



Das Vorkommen von Glucose im Hydrolysat konnte weiterhin mit dem hoch spezifischen Glucose-Oxidase-Test nachgewiesen werden. Es wurde eine starke Blaufärbung durch Oxidation des Chromogens beobachtet.

Besonders aufschlussreiche Resultate erhielten wir bei der enzymatischen Hydrolyse. Einzig bei der Zugabe von β -Glucosidase zum Inkubationsmedium wurde das Tyrosin freigesetzt, während sowohl α -Glucosidase als auch β -Galactosidase keinen hydrolytischen Abbau bewirkten (Abb. 4). Dies erbrachte den Beweis, dass zwischen Tyrosin und Glucose eine β -glucosidische Bindung besteht.

Die quantitativen Bestimmungen des Tyrosins und der Glucose nach saurer und enzymatischer Hydrolyse ergaben übereinstimmend ein Molarverhältnis von 1:1.

Gemäss unseren bisherigen Ergebnissen handelt es sich bei der vorliegenden *D. busckii*-spezifischen Substanz eindeutig um Tyrosin-O- β -glucosid. Dies ist das erste Mal, dass ein solches Glucosid bei *Drosophila* nachgewiesen wurde. Nach OKUBO (1958) enthält die Mutante *claret* (*ca*) von *D. melanogaster* das N-Acetylhydroxytyraminglucosid, welches als Entgiftungsprodukt des Hydroxytyramins aufzufassen ist.

Abbildung 5 zeigt die Veränderungen im Gehalt des Tyrosinglucosids und der gesamten restlichen ninhydrinpositiven Substanzen im Verlaufe der Entwicklung. Es fällt auf, dass das Glucosid in den *D. busckii*-Larven erst am 4. Tag nach der Eiablage

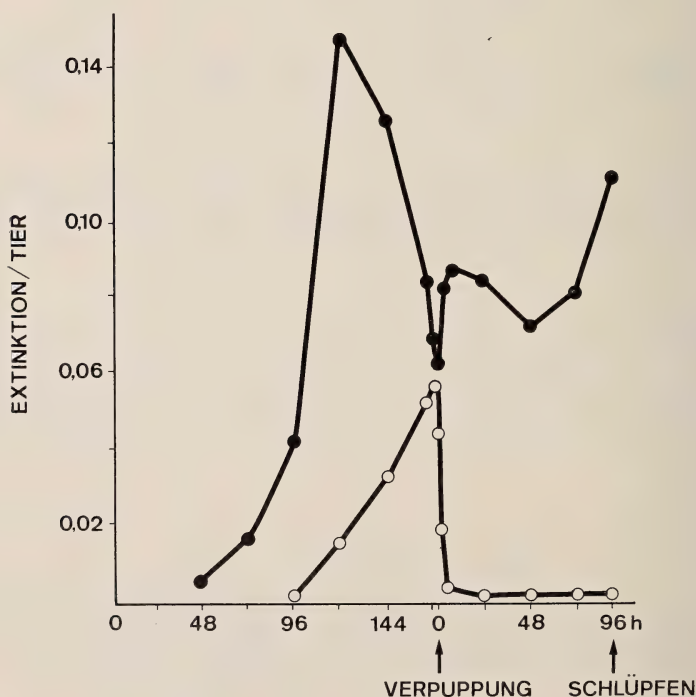


ABB. 5.

Quantitative Veränderungen des Tyrosinglucosids (○) und der gesamten ninhydrinpositiven Substanzen ohne Tyrosinglucosid (●) während der Larven- und Puppenentwicklung. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von 3 bis 5 Bestimmungen dar. Ordinate: Extinktion (E) pro Larve bzw. Puppe. Abszisse: Alter in Stunden (h) nach der Eiablage bzw. Verpuppung bei 25°.

feststellbar ist. Nachher nimmt es sehr rasch zu in seiner Konzentration, erreicht ein Maximum unmittelbar vor der Pupariumbildung, und fällt dann abrupt ab. Während der ganzen Puppenentwicklung kommt es nur spurenweise vor. Da die Gesamtkonzentration der übrigen ninhydrinpositiven Substanzen vom 5. Tag bis zur Verpuppung ständig abnimmt, steigt der relative Anteil des Glucosids fortwährend an. In den verpuppungsreifen Larven macht dieser mehr als 80% aus.

Ganz ähnliche Veränderungen im Verlaufe der Entwicklung fand man für Tyrosin-O-phosphat bei *Drosophila melanogaster* (MITCHELL & LUNAN 1964), β -Analyl-L-tyrosin bei *Sarcophaga bullata* (LEVENBOOK *et al.* 1969) und γ -L-Glutamyl-L-phenylalanin bei *Musca domestica* (BODNARYK 1970). Dies deutet darauf hin, dass das Tyrosinglucosid, wie diese phenolischen Verbindungen, ebenfalls als Tyrosinreserve für die Sklerotisierung der Cuticularproteine während der Pupariumbildung dient. Unsere Untersuchungen über die Biosynthese sowie die stoffwechselphysiologische Bedeutung des vorliegenden Glucosids sind im Gang.

LITERATUR

- BODNARYK, R. P. 1970. Biosynthesis of gamma-L-glutamyl-L-phenylalanine by the larva of the housefly *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* 16: 919-929.
- CHEN, P. S. 1975. Ein neues Trypsinderivat bei *Drosophila busckii*. *Revue suisse Zool.* 82: 673-675.
— 1977. Analysis of amino acids, peptides and related compounds. In "Analytical Biochemistry of Insects" (R. B. TURNER, ed.) pp. 131-169, Elsevier, Amsterdam.
- CLOTTEN R. und A. CLOTTEN. 1962. Hochspannungselektrophorese. S. 240-241. Thieme, Stuttgart.
- FISCHER, F. G. und H. DÖRFEL. 1953. Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweiss-Hydrolysaten. *Biochem. Z.* 324: 544-566.
- LEVENBOOK, L., R. P. BODNARYK and T. F. SPANDE. 1969. β -Alanyl-L-tyrosine. Chemical synthesis, properties and occurrence in larvae of the fleshfly, *Sarcophaga bullata* Parker. *J. Biochem.* 113: 837-841.
- MITCHELL, H. K. and K. D. LUNAN. 1964. Tyrosine-O-phosphate in *Drosophila*. *Arch. Biochem. Biophys.* 106: 219-222.
- OKUBO, S. 1958. Occurrence of N-acetylhydroxytyramine glucoside in *Drosophila melanogaster*. *Med. J. Osaka Univ.* 9: 327-337.
- SHERMA, J. and G. ZWEIG. 1971. Carbohydrate. In "Paper Chromatography and Electrophoresis" (G. ZWEIG und J. R. WHITAKER, eds.), Vol. II, pp. 156-159. Academic Press, New York.
- STAHL, E. 1967. Dünnschichtchromatographie. S. 772. Springer, Berlin.
- WOLFROM, M. L. and J. B. MILLER. 1956. Detection of carbohydrates on paper chromatograms. *Analyt. Chem.* 28: 1037.